

PCT/JP 2004/012425

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

23.08.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 2 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 3 4 4 4 4
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 3 4 4 4 4]

出 願 人 学 校 法 人 日 本 大 学
Applicant(s):

REC'D 07 OCT 2004

WIPO

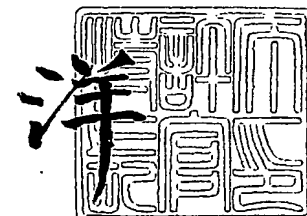
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 8 5 8 9 8

【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0134
【提出日】 平成15年 9月25日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 G01N 33/50
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 江角 眞理子
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 高山 忠利
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 2 4 号 学校法人 日本大学内
 【氏名】 高木 恵子
【特許出願人】
 【識別番号】 899000057
 【氏名又は名称】 学校法人日本大学
【代理人】
 【識別番号】 100092783
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 浩
 【電話番号】 03-3273-2611
【選任した代理人】
 【識別番号】 100095360
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 片山 英二
【選任した代理人】
 【識別番号】 100093676
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小林 純子
【選任した代理人】
 【識別番号】 100120134
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 大森 規雄
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-299363
 【出願日】 平成15年 8月22日
 【整理番号】 P03-0097
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 157061
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

(b) 表 1～8 に示される遺伝子から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定し

、
(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること
を含む前記方法。

【請求項 2】

癌の評価方法であって、以下のステップ：

(a) 検体から total RNA を採取し、

(b) RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝子及びQPRT 遺伝子
からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること
を含む前記方法。

【請求項 3】

癌の評価が、転移の有無又は再発の有無の予測である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 4】

癌が肝細胞癌である請求項 1 又は 2 記載の方法。

【請求項 5】

遺伝子の発現量の測定が、配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～21 の整数を表わす) で示され
る塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組用いて遺伝子を増幅すること
により行なわれるものである請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～21 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライ
マーの組合せを少なくとも 1 組含むプライマーセット。

【請求項 7】

表 1～8 に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

【請求項 8】

RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝子及びQPRT 遺伝子から
なる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

【請求項 9】

さらに請求項 6 記載のプライマーセットを含む、請求項 7 又は 8 記載のキット。

【書類名】明細書

【発明の名称】肝細胞癌に関連する遺伝子

【技術分野】

【0001】

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に肝細胞癌の再発に関連する遺伝子に関する。

【背景技術】

【0002】

肝細胞癌のほとんどは、ウイルス性肝炎による慢性肝炎から発症する。その原因ウイルスは、C型肝炎ウイルスとB型肝炎ウイルスである。いずれも持続感染すると治療はなく、肝硬変、肝細胞癌発症の恐怖と立ち向かうほかない。インターフェロンが肝炎治療薬として使用されているが、有効例はわずか30%であり、必ずしも十分な治療薬とはいえない。特に慢性肝炎ではほとんど有効例を見ないのが現状である。しかし、たとえウイルスが排除できなくとも、病態の進展を抑えることができれば、肝硬変や肝細胞癌の予防につながるため、病態の進展因子を分子レベルで明らかにすることが重要となる。

【0003】

一方、一度肝細胞癌が発生すると、外科的根治術がなされても、残肝再発は高頻度に出現する。肝癌の術後5年生存率は全国集計で51%であり、肝切除後1年で約25%、2年で50%、5年では80%の症例で再発が起こることが報告されている。こうなると、残肝組織は正常肝組織とはいえず、すでに肝細胞癌再発の芽が存在するとも考えられる。現在、再発危険因子として、腫瘍最大径、個数、門脈腫瘍栓、術前AFP値、肝内転移、肝硬変の有無などが報告されている。しかし、肝細胞癌再発の予測および予防法を開発するには、これら危険因子にも関連する、再発の有無を決定する因子を分子レベルでとらえる必要がある。これは、再発だけでなく、肝細胞癌発症や病態の進展そのものにも関わる因子であると考えられる。近年、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析により、病態を遺伝子全体の発現パターンの違いにより、より詳細に分類できるようになってきた。これまで癌の分類には主に組織学的、免疫学的手法が用いられてきたが、同じ型に分類された癌でも臨床経過、治療効果が症例によって異なっている。これらを詳細に分類できる手法があれば、個々に応じた治療が可能となる。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析は、このような癌の予後を知る上で、強力な方法と考える。

【0004】

今までに、肝細胞癌に関わるDNAマイクロアレイ解析では、

- (i) 癌部、非癌部間において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献1、非特許文献3)
 - (ii) 癌組織の分化度において、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献1、非特許文献2)
 - (iii) B型肝炎由来の肝細胞癌と、C型肝炎由来の肝細胞癌とでは、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献2)
 - (iv) 肝細胞癌血管浸潤の有無により、どのような遺伝子に発現の違いが見られるか？(非特許文献2)
 - (v) 多結節性肝細胞癌のクローン解析を行い、肝内転移癌に共通して見られる遺伝子の発現変化は何か？(非特許文献4)
- などが明らかにされている。しかしながら、再発に関与する遺伝子に関しては、飯塚ら(非特許文献5)の癌組織での解析にとどまる。残肝組織を反映する非癌部肝組織での解析は、未だなされていない。

【非特許文献1】Shirota Y, Kaneko S, Honda M, et al. Identification of differentially expressed gene in hepatocellular carcinoma with cDNA microarrays. Hepatology 2001; 33 : 832-840

【非特許文献2】Okabe H, Satoh S, Kato T, et al. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray : Ide

ntification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. Cancer res. 2001 ; 61 : 2129- 2137

【非特許文献 3】 Xu X, Huang J, Xu Z, et al. Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. Proc . Nat. Acad. Sci. USA . 2001; 98: 15089-15094

【非特許文献 4】 Cheung S, Chen X, Guan X, et al. Identify metastasis-associated gene in hepatocellular carcinoma through clonality delineation for multi nodeular tumor. Cancer res. 2002 ; 62 : 4711- 4721

【非特許文献 5】 Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. Lancet 2003; 361: 923-929

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、肝細胞癌に関連する遺伝子、特に癌の再発を予測する遺伝子を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、肝細胞癌の再発を起こした症例と再発のなかった症例から遺伝子発現のプロファイルを検討した結果、肝細胞癌に関連する遺伝子を同定することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は以下の通りである。

【0008】

(1) 癌の評価方法であって、以下のステップ:

(a) 検体から total RNA を採取し、

(b) 表 1～8 に示される遺伝子の中の少なくとも 1 つ以上の遺伝子の発現量を測定し、

(c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること

を含む前記方法。

【0009】

本発明においては、表 1～8 に示される遺伝子のうち、例えば RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝子及び QPRT 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子を用いることができる。

【0010】

癌の評価は、転移の有無又は再発の有無を予測するというものである。また、癌としては、例えば肝細胞癌が挙げられる。

【0011】

遺伝子の発現量の測定は、配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～21 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組用いて、遺伝子を増幅することにより行なうことができる。

【0012】

(2) 配列番号 2n-1 及び 2n (n は 1～21 の整数を表わす) で示される塩基配列からなるプライマーの組合せを少なくとも 1 組含むプライマーセット。

【0013】

(3) 表 1～8 に示されるいずれかの遺伝子を含む、癌の評価用キット。

【0014】

上記示される遺伝子としては、例えば RALGDS 遺伝子、GBP1 遺伝子、DKFZp564F212 遺伝子、TNFSF10 遺伝子及び QPRT 遺伝子からなる群から選ばれる少なくとも 1 つの遺伝子が挙げられる。

【0015】

また、本発明のキットには前記プライマーセットを含めることができる。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、肝細胞癌の再発を予知するために有用な遺伝子が提供される。この遺伝子の発現亢進状態を解析することで、癌を評価することができる。特に、本発明の遺伝子を用いることにより、肝細胞癌の再発を予知することができ、得られた予知情報はその後の治療方針に有用である。また、これらの遺伝子および遺伝子産物を用いて、再発予防の治療法を開発することが可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

本発明は、肝細胞癌切除後の長期間のフォローアップ臨床データから、予後不良の症例群（例えば1年以内に再発して2年以内に死亡する症例群）と、予後良好の症例群（例えば4年以上再発がない症例群）とに分け、切除した肝組織に発現する遺伝子群の特徴から、予後を不良にする遺伝子又は予後を良好にする遺伝子（例えば再発促進に関わる遺伝子と再発抑制に関わる遺伝子）を同定することを特徴とする。本発明は、臨床データをもとにして、原因ウイルス別にB型肝炎症例とC型肝炎症例とに分け、各々非癌部の組織及び癌部の組織から、予後の相関関係を有する遺伝子を同定するというものである。

【0019】

本発明の遺伝子は、どの症例の、どの病態のときの、どの遺伝子を調べると、遺伝子と病態との相関関係がわかるのかについて、実際に患者から採取した組織と病態との相関関係を解析することによって、明らかにされたものである。

【0020】

1. 被検サンプルの分類

被検サンプルは、肝癌手術後の経過を観察し、再発早期群と遅延群とに分類する。

【0021】

再発早期群とは、切除術後、一定期間内に再発してその後死亡する症例群を意味する。再発までの期間としては特に限定されるものではないが、例えば1年以内又は2年以内を例示することができる。死亡するまでの期間も特に限定されるものではないが、例えば、再発から1年以内、2年以内又は3年以内などが挙げられる。遅延群とは、一定期間以上（例えば3年以上、好ましくは4年以上）再発がない症例群を意味する。

【0022】

実際には33症例のstage Iおよびstage IIの肝細胞癌手術症例を対象とした。その内訳は、B型肝炎症例が6例、C型肝炎症例が23例、非B非C型肝炎症例が4例を含む。これらのフォローアップ臨床データをもとに、再発早期群としてB型肝炎症例から2例、C型肝炎症例から3例を、再発遅延群としてB型肝炎症例から2例、C型肝炎症例から3例を選んだ。これら10例の非癌部および癌部組織のRNAについて、以下の発現プロファイル解析を行った。

【0023】

2. 遺伝子の解析

前記の通り分類された群の肝組織からtotal RNAを抽出し、各群間のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルと比較する。total RNAの抽出は、市販の試薬（例えばトリゾール）を用いることにより行うことができる。発現プロファイルの検出は、例えばマイクロアレイ（アフィメトリクス社）を用いる。

【0024】

さらに、本発明は、癌部のほか非癌部の組織において変動する遺伝子を解析することができる。ここで、非癌部とは、肝細胞癌切除術時に含まれる肝組織であって、癌細胞が含まれていない部分を意味する。但し、「非癌部」は必ずしも正常肝組織であるとは限らず、慢性肝炎又は肝硬変を呈する組織も含まれる。このような組織がほとんどであるB型肝炎

炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子を解析の対象とすることができ、慢性肝炎又は肝硬変を呈する組織の場合は、壊死炎症反応や肝再生結節、脱落肝細胞を補う繊維化などが観察され、中には肝細胞癌発生に向けて予備軍となりうる細胞も存在する。従って非癌部組織にこそ予後と関係する遺伝子発現が存在すると考えられ、その遺伝子発現の変動を解析することで、予後（例えば再発）を予知することができる。

【0025】

遺伝子発現の変動と表現型（再発、早期進行等）との相関関係から、癌を評価するための遺伝子を同定する。癌の評価とは、癌の病態や進行度に関する評価を意味し、転移の有無、再発の有無などを予測することが挙げられる。

【0026】

本発明では、特に再発に関連して発現が促進又は抑制される遺伝子を提供する。再発とは、原発病巣に対する治療が完了したと判断された後に、同様の組織型と考えられる病巣が新たに肝内・肝外を問わず出現することをいう。

【0027】

3. 遺伝子の評価

同定された遺伝子について、病態進展を抑える因子として使えるか、病態モデル細胞や動物で、評価する。すなわち、(1)予後のわかっている残りの肝細胞癌症例について遺伝子発現定量解析を行い、予後と相関するか否かを検討する。

【0028】

(2)肝細胞癌培養細胞株に遺伝子導入して発現させ、その細胞増殖性、悪性度の変化を、軟寒天培地下でのコロニー形成能やヌードマウスでの腫瘍形成能で評価する。(3)慢性肝炎患者より樹立した肝細胞培養株を用いて、遺伝子導入し発現させ、その細胞増殖性、悪性転換を、上記(2)の方法と同様の方法で評価する。(4)肝細胞癌発癌モデル動物の肝臓に遺伝子導入して発現させ、肝発癌までの経過で評価する。

【0029】

上記(1)において、遺伝子発現の定量解析は、例えばリアルタイムPCRにより行う。すなわち、上記のように作製したtotal RNAに市販の逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。PCR試薬は市販のものを用いることができ、PCRの条件も市販のプロトコールにしたがってよい。例えば、予備加熱を95℃、10分行ったのち、95℃15秒に続けて60℃(または65℃)、60秒を40サイクルという条件である。対象とする内部標準遺伝子としては、glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase(GAPDH)を用いることができる。解析方法は発現量の絶対的定量解析または相対的定量解析が採用される。ここで、発現量の絶対的定量とは、検量線が最適となる閾値線(threshold line)を決定し、各サンプルの閾値PCRサイクル数、threshold cycle(Ct)値を求めることにより得られるものであり、発現量の相対的発現量は、標的遺伝子のCt値からGAPDHのCt値を差し引いた ΔCt 値で表されるものである。線形発現量の評価には、 $(2^{-\Delta Ct})$ の計算式で計算したものをを用いることができる。

【0030】

検量線を作成する場合には、標準試料の系列希釈を行って同時に測定したもの（同じ反応溶液を使って、同じプレートに入れ、同時期に測定したもの）を用いてよい。

検量線より絶対発現量を換算できる場合は、標的遺伝子および内部標準遺伝子の絶対発現量を求めて、サンプルごとに標的遺伝子発現量/内部標準遺伝子発現量の比を算出することにより、評価に用いることができる。

【0031】

再発遅延群および再発早期群のマイクロアレイの結果から遺伝子を選択して、上記の方法を用いて得られたリアルタイムPCRの結果がマイクロアレイの結果と一致する遺伝子のうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子を、たとえば非癌部発現亢進遺伝子と同定することができる。

【0032】

本発明の遺伝子の全長配列は、以下のようにして得ることができる。すなわち、DNA データベースより検索し、既知の配列情報として得ることができる。あるいは、ヒト肝臓cD

NAライブラリーより、ハイブリダイゼーションスクリーニングにより単離する。

【0033】

本発明において、再発が早期になかった症例（再発遅延）において発現が亢進される遺伝子としては、表1～表4に示されるものがあり、再発が早期にあった症例において発現が亢進される遺伝子としては、表5～8に示されるものがある。

【0034】

- 表1：B型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (24)
- 表2：C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (10)
- 表3：B型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (137)
- 表4：C型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (104)
- 表5：B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (49)
- 表6：C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12)
- 表7：B型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75)
- 表8：C型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (38)

【表 1】

表1 B型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (24) (BNgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	TNFSF14	
2	MMP2	
3	SAA2	B型癌遅延群
4	COL1A1	
5	COL1A2	
6	DPYSL3	
7	PPARD	
8	LUM	
9	MSTP032	
10	CRP	
11	TRIM38	
12	S100A6	
13	PZP	
14	EMP1	
15	AI590053	
16	MAP3K5	
17	TIMP1	
18	GSTM1	B型癌遅延群
19	CSDA	
20	GSTM2	B型癌遅延群
21	SGK	B型癌遅延群
22	LMNA	
23	MGP	
24	LTBP2	

【表 2】

表2 C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (10) (CNgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	M10098	C型癌遅延群
2	LMP7	
3	RALGDS	
4	APOL3	
5	GBP1	
6	RPS14	
7	CXCL9	
8	DKFZp564F212	
9	CYP1B1	
10	TNFSF10	

【表 3】

表3 B型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (139) (BTgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	HP	
2	M10098	C型癌遅延群
3	CYP2E1	
4	HDL	C型癌遅延群
6	GPX4	
7	G0S2	
8	HAO2	
9	ATF5	C型癌遅延群
10	MT1F	C型癌遅延群
11	CYP3A4	C型癌遅延群
12	Scd	
13	SERPINA7	
14	AKR1D1	
15	AL031602	
16	TSC501	
17	GSTM1	B型非癌遅延群 C型癌遅延群
18	SAA2	B型非癌遅延群
19	BHMT	C型癌遅延群
20	HADHSC	
21	FBXO9	
22	KIAA0442	
23	KIAA0293	C型癌遅延群
24	IGHG3	
25	ADH2	C型癌遅延群
26	GSTM2	B型非癌遅延群 C型癌遅延群
27	PPIF	
28	ALDH8A1	

番号	遺伝子	重複グループ
29	IGLJ3	
30	HCN3	
31	ADH6	C型癌遅延群
32	AK02720	C型癌遅延群
33	NET-6	
34	CYP2D6	
35	MAFB	
36	GHR	
37	KHK	
38	ADFP	
39	LCE	
40	MPDZ	C型癌遅延群
41	TEM6	
42	KIAA0914	
43	KLKB1	
44	M11167	C型癌遅延群
45	SGK	B型非癌遅延群
46	EHHADH	
47	MBL2	C型癌遅延群
48	APP	
49	MT1G	
50	TPD52L1	C型癌遅延群
	CXCL10	
51	AI972416	
52		
53	FCGR2B	
54	IGL@	
55	FLJ10134	

番号	遺伝子	重複グループ
56	PPAP2B	
57	CDC42	
58	HBA2	
59	CYP1A2	C型癌遅延群
60	CYP2B6	
61	DKFZP586B1621	
62	MTP	
63	X07868	
64	RNAHP	C型癌遅延群
65	HLF	C型癌遅延群
66	PPP1R3C	
67	CDC2L2	
68	NRIP1	
69	GPD1	
70	KIAA1053	
71	GCL19	
72	CRJ1	
73	THBS1	C型癌遅延群
74	SLC5A3	
75	GADD45B	
76	AGL	
77	ADK	
78	IGKC	
79	CYP2A6	C型癌遅延群
80	GADD45A	C型癌遅延群
81	FLJ20701	
82	LOC57826	

番号	遺伝子	重複グループ
83	SLC2A2	
84	CIRBP	
85	CGI-26	
86	DEFB1	
87	HMGCS1	
88	ODC1	
89	GLUL	C型癌遅延群
90	CYP27A1	
91	SULT2A1	C型癌遅延群
92	AK024828	
93	PHLDA1	
94	NR1I2	
95	MSRA	
96	RNASE4	
97	AI339732	
98	HBA2	
99	AL050025	
100	CSAD	
101	SID6-306	
102	NM024561	
103	BCKDK	
104	SLC6A1	
105	CG018	
106	GNE	
107	CKLFSF6	
108	COMT	
109	AL135960	
110	KIAA0179	

番号	遺伝子	重複グループ
111	c-maf	
112	OSBPL11	
113	R06655	C型癌遅延群
114	KIAA04461	
115	IGF1	C型癌遅延群
116	HBA1	
117	LOC55908	
119	ENPEP	
120	TXNIP	
121	KIAA0624	
122	ENPP1	
123	CYP4F3	
124	CAV2	
125	BE908931	
126	LECT2	
127	MLLT2	
128	FLR1	
129	TF	
130	DAO	
131	AI620911	
132	GBP1	
133	UGP2	
134	GADD45B	
135	SC4MOL	
136	BE908931	
137	TUBB	
138	EPHX2	
139	SORD	

【表 4】

表4 C型肝炎症例の再発遅延群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (104) (CTgood)

番号	遺伝子	重複グループ
1	LEAP-1	
2	PPD	
3	HDL	B型癌遅延群
4	CYP3A4	B型癌遅延群
5	CYP2A6	B型癌遅延群
6	M10098	C型非癌遅延群 B型癌遅延群
7	RACE	
8	SLC27A5	
9	FLJ20581	
10	FLJ10851	
11	KIAA0293	B型癌遅延群
12	C9	
13	AL354872	
14	AKR1C1	
15	PCK1	
16	GSTM1	B型癌遅延群
17	CYP1A2	B型癌遅延群
18	ANGPTL4	
19	AOX1	
20	SDS	
21	GSTM2	B型癌遅延群
22	M11167	B型癌遅延群
23	CYP2C9	
24	SIPL	
25	GLYAT	
26	MBL2	B型癌遅延群
27	CYP1A1	

番号	遺伝子	重複グループ
28	CRP	
29	R06655	B型癌遅延群
30	ACADL	
31	HLF	B型癌遅延群
32	NR1I3	
33	CA2	
34	CYP2C8	
35	PON1	
36	ADH2	B型癌遅延群
37	RNAHP	B型癌遅延群
38	AQP9	
39	SULT2A1	B型癌遅延群
40	SPP1	
41	KIAA0934	
42	AKAP12	
43	APOF	
44	FMO3	
45	SLC22A1	
46	DCXR	
47	CYP3A7	
48	SOCS2	
49	THBS1	B型癌遅延群
50	ATF5	B型癌遅延群
51	BCRP	
52	ADH6	B型癌遅延群
53	humNRDR	
54	GADD45G	

番号	遺伝子	重複グループ
55	SRD5A1	
56	ABCA8	
57	AK026720	B型癌遅延群
58	APOC4	
59	FTHFD	
60	ISG15	
61	IGFBP2	
62	BHMT	B型癌遅延群
63	: DNASE1L3	
64	SRD5A1	
65	E2IG4	
66	COL1A2	
67	C20orf46	
68	ESR1	
69	BLVRB	
70	LRP16	
71	SLC1A1	
72	ABCB6	
73	MPDZ	B型癌遅延群
74	FBP1	
75	ALAS1	
76	IFIT1	
787	PPARGC1	
78	Id-1H	
79	RBP1	
80	CSHMT	
81	LOC155066	
82	MT1F	B型癌遅延群

番号	遺伝子	重複グループ
83	AGXT2L1	
84	TIMM17A	
85	SEC14L2	
86	MAOA	
87	MYC	
88	ACAA2	
89	AL109671	
90	ABCA6	
91	IGF1	B型癌遅延群
92	GRHPR	
93	HADH2	
94	AFM	
95	COL1A1	
96	MTHFD1	
97	NMT2	
98	GADD45A	B型癌遅延群
99	UGT2B15	
100	AR	
101	TPD52L1	B型癌遅延群
102	sMAP	
103	GLUL	B型癌遅延群
104	dJ657E11.4	

【表 5】

表5 B型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (49) (BNbad)

番号	遺伝子	重複グループ
245	CTH	B型癌早期群
246	OAT	
247	PRODH	B型癌早期群
248	CYP3A7	
249	DDT	B型癌早期群
250	PGRMC1	
251	AKR1C1	
252	HGD	B型癌早期群
253	FHR-4	
254	AL354872	
255	FST	B型癌早期群
256	COX4	
257	APP	
258	PSPHL	
259	CYP1A1	
260	ZNF216	
261	LEPR	B型癌早期群
262	TOM1L1	
263	PECR	
264	ALDH7A1	
265	GNMT	
266	OATP-C	
267	AKR1B10	C型非癌早期群 B型癌早期群
268	ANGPTL3	
269	AASS	
270	CALR	

番号	遺伝子	重複グループ
271	BAAT	
272	PMM1	
273	RAB-R	
274	FLJ20406	
275	GLUL	
276	CSHMT	
277	UGT1A3	
278	HSPG1	
279	QPRT	C型非癌早期群
280	DEPP	
281	CA2	B型癌早期群
282	FTHFD	
283	LAMP1	
284	FKBP1A	
285	BNIP3	
286	MAP3K12	
287	ASS	B型癌早期群
288	ACTB	
289	PLAB	B型癌早期群
290	ENO1L1	
291	IGFBP3	
292	UK114	
293	ERF-1	

【表 6】

表6 C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子 (12) (CNbad)

番号	遺伝子	重複グループ
294	ALB	
295	NR0B2	
267	AKR1B10	B型非癌早期群 B型癌早期群
296	MAFB	
297	BF530535	
298	MRPL24	
299	DSIP1	
279	QPRT	B型非癌早期群
300	VNN1	
301	IRS2	
302	FMO5	
303	DCN	

【表 7】

表7 B型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (75)

(BTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
247	PRODH	B型非癌早期群
304	PLA2G2A	C型癌早期群
305	SDS	
306	LGALS3BP	
307	BACE2	
261	LEPR	B型非癌早期群
308	RCN1	
309	MRC1	
310	TM4SF5	
311	NK4	
312	PABL	
313	IGFBP2	
314	GRINA	
315	IFI27	
316	GP2	
317	GA	
318	P4HA2	
319	KYNU	
320	PCK1	
321	UQBP	
322	HLA-DRB1	
252	HGD	B型非癌早期群
323	HTATIP2	
324	GGT1	
325	CTSH	
326	MVP	
327	SLC22A1L	

番号	遺伝子	重複グループ	
328	GMNN		
329	COM1		
330	TM7SF2		
245	GTH	B型非癌早期群	
331	KDEL3		
332	VPS28		
281	CA2	B型非癌早期群	
333	SFN		
334	NM023948		
335	OPLAH		
336	DGCR6		
337	INSIG1		
267	AKR1B10	B型非癌早期群	C型非癌早期群
338	PTGDS		C型癌早期群
339	SLC25A15		
340	SEPW1		
341	CD9		
342	UQCRB		
287	ASS	B型非癌早期群	
343	CPT1A		
289	PLAB	B型非癌早期群	
344	GPAA1		
345	HF1		
346	GPX2		
347	COPEB		
348	NDRG1		
349	SYNGR2		

番号	遺伝子	重複グループ
350	GOT1	
351	POLR2K	
352	AATF	
255	FST	B型非癌早期群
353	OAZIN	
354	RPL7	
355	KIAA0128	
356	CLDN7	
357	ABCB6	
358	GK	
359	LU	C型癌早期群
360	TNFSF4	
361	OSBPL9	
362	GSN	
363	LGALS4	
249	DDT	B型非癌早期群
364	EIF3S3	
365	SLC12A2	
366	RAMP1	
367	HSPB1	
368	AI201594	

【表 8】

表8 C型肝炎症例の再発早期群で、癌部において発現亢進する遺伝子 (38) (CTbad)

番号	遺伝子	重複グループ
369	BL34	
370	AL022324	
371	IGHM	
372	TXNIP	
373	FSTL3	
374	AW978896	
375	NM018687	
376	L48784	
377	AJ275355	
378	PER1	
379	CYBA	
304	PLA2G2A	B型癌早期群
380	SGK	
381	FKBP11	
382	AI912086	
383	IGLJ3	
384	IGKC	
338	PTGDS	B型癌早期群
385	M20812	
386	AGRN	
387	IL2RG	
388	X07868	
389	PKM2	
390	FGFR3	
391	TRB@	
392	TNFAIP3	
393	TTC3	

番号	遺伝子	重複グループ
394	LPA	
395	AL049987	
396	IER5	
397	BSG	
398	TM4SF3	
399	HMGB2	
359	LU	B型癌早期群
400	CCL19	
401	PAM	
402	PIK3R1	
403	RANGAP1	

上記遺伝子は、単独で、又は適宜組み合わせで癌の評価用キットに含めることができる。上記遺伝子はその一部の配列であってもよい。これらの遺伝子は、表に記載の遺伝子発現を検出するためのプローブとして使用することができる。

【0035】

また、本発明のキットには、遺伝子増幅用プライマー、緩衝液、ポリメラーゼ等を含めてもよい。

【0036】

遺伝子増幅用プライマーは、各遺伝子配列のDNA配列およびmRNA配列をデータベースより得、特にvariantの有無、エキソンイントロン構造を含めた情報も得るようにして、翻訳領域に当たる部分で共通な配列をターゲットとする。なるべく片側プライマーは隣接エキソンにまたがるようにして、mRNAだけが検出されるように設計する。

【0037】

好ましいプライマーの配列番号を一般式 $2n-1$ 及び $2n$ (n は1~21の整数を表わす)に示す。本発明においては、 $2n-1$ により示されるプライマーと $2n$ により示されるプライマーとを1組のセットとして用いることができる。例えば、 n を1とすると、配列番号1と配列番号2のプライマーを1組のプライマーセットを、 n を2とすると、配列番号3と配列番号4のプライマーのセットを使用することができる。特に好ましいプライマーは、 n が2、4、7、9、17で示される場合である。

【0038】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】

【0039】

肝炎症例中の発現亢進遺伝子の検出

以下のように、B型およびC型、非B非C型慢性肝炎及び肝細胞癌症例のヒト肝組織を用いて、肝細胞癌再発抑制分子の同定を遺伝子レベルで進めた。

【0040】

肝細胞癌術後の再発機構を知り、再発の有無を予測できる遺伝子を決めるため、再発時

期の異なる症例を用いて遺伝子発現プロファイル解析を行なった。TNM分類でstage I、IIの33症例を対象とした。術後4年以上再発のない5例と、術後1年以内に再発した5例を選び、Affymetrix社HG-U133Aアレイで発現解析を行なった。

【0 0 4 1】

凍結保存した組織にTRIzol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD)を加えて、ポリトロンにてホモジネートした。ホモジネート液にクロロホルムを加えてよく混和し遠心した。遠心後、上層を回収し、イソプロパノールを等量加えて、total RNA沈殿を遠心にて回収した。

【0 0 4 2】

B型肝炎症例の再発早期群2例の非癌部と癌部、再発遅延群2例の非癌部と癌部、C型肝炎症例の再発早期群3例の非癌部と癌部、再発遅延群3例の非癌部と癌部、合計8群に分け、発現解析を行った。

【0 0 4 3】

各サンプル群につき15 μ gのtotal RNAを用意し、Affymetrix社GeneChip Expression Analysis Technical Manualに基づいて、ビオチン標識cRNAを合成した。T7-(dt)₂₄ プライマーとSuperscript II逆転写酵素 (Invitrogen Life Technology)を用いて、1時間反応させ第一鎖cDNAを合成した。その後、E. coli DNA リガーゼ、E. coli DNAポリメラーゼ、E. coli RNase Hを加え16℃ 2時間反応させ、最後にT4 DNAポリメラーゼを加えて二本鎖cDNAを合成した。クリーンアップを行った後、BioArray high yield RNA transcript labeling kit (Affymetrix, Inc, CA)を用いて、37℃ 4時間in vitro 転写し、ビオチン標識cRNAを合成した。Technical manualに基づき、ハイブリダイゼーションプローブ溶液を作製し、プレハイブリダイゼーションを45℃ 45分間行ったGeneChip HG-U133A (Affymetrix, Inc, CA ; 22283個のヒト遺伝子が含まれている)に加え、ハイブリダイゼーションを45℃ 16時間行った。その後、GeneChip Fluidics Station 400 (Affymetrix, Inc, CA)を用いて洗浄した後、ストレプトアビジンフィコエリスリンとビオチン化抗ストレプトアビジンにて染色を行った。その後、HP GeneArray スキャナー (Affymetrix, Inc, CA)にてスキャンを行った。

【0 0 4 4】

データ解析は、GeneSpring ver.5.0 (SiliconGenetics, Redwood, CA)を用いて行った。normalization後、内在性定量用コントロール遺伝子BioBのシグナルを検出限界(細胞あたり数コピーに相当する)として参考にし、100以上の輝度を持ち、なおかつ、シグナルフラッグが最低1チップでもpresentの遺伝子を対象とした。7444遺伝子を対象となり、非癌部では再発早期群/遅延群間で2.5倍以上差のある遺伝子を同定した。癌部では3倍以上差のある遺伝子を同定した。

【0 0 4 5】

その結果、絞り込んだ7444遺伝子で、再発なし/ありの非癌部間で2.5倍以上差のある遺伝子は、up34個とdown59個、癌部間で3倍以上差のある遺伝子は、up215個とdown110個であった。これらの中でB型/C型共通に再発なしで発現亢進する遺伝子は、非癌部で0個、癌部で26個であった。一方、B型/C型共通に再発ありで発現亢進する遺伝子は、非癌部で2個、癌部で3個であった。また、癌部/非癌部共通に発現亢進する遺伝子があり、再発なしで5個、再発ありで10個であった。(表9)。

【表 9】

表9 肝細胞癌再発に関わる遺伝子

	再発遅延群で発現亢進		再発早期群で発現亢進		共通
	非癌部	癌部	非癌部	癌部	
B型肝炎	24	137	49	75	4 10
C型肝炎	10	104	12	38	1 0
共通	0	26	2	3	
合計	34	215	59	110	244 159

合 計 403

表9の結果より、再発予後の違いは、非癌部より癌部のほうに遺伝子発現変化が大きく、C型肝炎症例よりはB型肝炎症例の方が遺伝子発現の差が大きいと言える。また、原因ウイルスとは無関係に共通して再発予後に関わる遺伝子が、見つかる場合があるが、意外に少ない。発癌と同様、再発も原因ウイルス別に異なる機構が関与していると考えられる。

【0046】

サンプル系統樹解析では、全遺伝子の発現プロファイルから、まず非癌部と癌部に分かれ、各々非癌部と癌部は、再発予後ではなく、原因ウイルスによる近縁関係が観察された(図1)。図1において、各試験群を示す「BNbad」、「BNgood」などの表記において、第1番目のアルファベットはウイルスの種類を示し、「B」はB型肝炎ウイルス、「C」はC型肝炎ウイルスを意味する。第2番目のアルファベットの「N」は非癌部、「T」は癌部を意味する。そして「bad」は再発有り、「good」は再発なしを意味する。

【0047】

このことは、再発予後に影響する遺伝子発現は、限られた遺伝子の発現変化でもたらされるものと考えられる。

【0048】

以上のことから、再発の機構解明や有無を予測できる候補遺伝子が見出された(表1～8)。

【実施例2】

【0049】

C型肝炎症例における各群の遺伝子の再発期間と発現量の相関の検討

以下のとおり、C型肝炎症例のうち、再発遅延群と再発早期群各々の非癌部において発現亢進する遺伝子について、再発までの期間と発現量との相関を検討した。

【0050】

遺伝子発現プロファイル解析に用いたC型肝炎細胞癌症例6例を含め、計22例の非癌部を対象とした。各症例の臨床病理学的知見と再発までの期間(再発なしの期間)を表10に示す。

【表 1 0】

表10 C型肝細胞癌症例

症例番号	性別	年齢	非癌部	stage	再発なしの月数	マイクロアレイ
59	M	66	CH	I	84	遅延群
18	M	68	LC	I	58	遅延群
6	M	65	CH	II	51	遅延群
25	M	51	CH	I	45	
29	M	70	CH	II	43	
12	M	66	CH	II	41	
4	M	65	CH	I	40	
48	F	65	LC	I	39	
31	M	60	LC	I or II	38	
16	M	70	CH	I	37	
22	M	65	CH	I	34	
3	F	71	LC	I	29	
65	M	60	LC	I	29	
30	F	62	LC	II	28	
10	M	56	LC	I	26	
23	M	62	CH	II	16	
26	M	70	LC	I	16	
14	M	62	CH	II	14	早期群
62	M	66	LC	I	13	
17	M	54	LC	I	12	
15	F	68	LC	II	8	早期群
44	M	58	CH	I	4	早期群

CH: 慢性肝炎、LC: 肝硬変

症例31のstageは、未決定。

再発なしの月数とは、再発までの月数の他、調査期間中再発がみられないものも含む。

表 2 における再発遅延群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (CNgood) を 9 個、表 6 における再発早期群の非癌部において発現亢進する遺伝子 (CNbad) を 12 個の合計 21 個の遺伝子を対象とした。

【 0 0 5 1】

各症例非癌部肝組織から、上記実施例 1 と同様の方法で total RNA を抽出した。

【 0 0 5 2】

total RNA 中に混在する DNA の影響を除去するため、DNase I (DNase I (TAKARA SHUZO, Kyoto, Japan) で 37℃、20 分処理した後、TRIzol reagent で再精製した。10 μg の total RNA を用いて 25 unit の AMV reverse transcriptase XL (TAKARA) と 250 pmol の 9-mer ランダムプライマーを含む 100 μl の反応液により逆転写反応を行った。

【 0 0 5 3】

リアルタイム PCR には、上記実施例 1 で作製した合成 cDNA を各々 0.5 μl ずつ用いて行った。SYBR Green PCR Master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) の 25 μl の反応溶液を用いて ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) により、予備加熱を 95℃、10 分行ったのち、95℃ 15 秒に続けて 60℃ (または 65℃)、60 秒を 40 サイクルという条件で PCR を行った。

【 0 0 5 4】

各サンプルの内部標準遺伝子として、glyceraldehyde 3-phosphatase dehydrogenase (GAPDH) を用いて相対的定量解析、および一部は絶対的定量解析を行った。標準試料の系列希釈を行って同時に測定したものを検量線作成に用いた。検量線が最適となる閾値線 (threshold line) を決定し、各サンプルの閾値 PCR サイクル数、threshold cycle (Ct) 値を求めた。標的遺伝子の Ct 値から GAPDH の Ct 値を差し引いた ΔCt 値を求め、これをその標的遺伝子の相対的発現量とした。さらに、 $2^{(-\Delta Ct)}$ の計算式で計算したものを、線形発

現量を評価に用いた。

【0055】

一方、検量線より絶対発現量を換算できる遺伝子については、標的遺伝子および内部標準遺伝子の絶対発現量を求め、サンプルごとに標的遺伝子発現量／内部標準遺伝子発現量の比を算出して評価に用いた。測定はすべてduplicateで行った。

【0056】

試験に用いたプライマー配列を表11および表12に示す。

【表11】

表11 「C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順／逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致	相関
26	LMP7	順	AGACTGTCAGTACTGGGAGC	1	60°C	O(2.52)	
		逆	GTCCAGGACCCTTCTTATCC	2			
27	RALGDS	順	GACGTGGGAAGACGTTTCCA	3	60°C	O(4.13)	O(p=0.0118)
		逆	TGGATGATGCCCGTCTCCTT	4			
28	APOL3	順	AATTGCCCGAGGATGAGGCA	5	60°C	O(2.69)	
		逆	TGGAOTCOTGGATOTTCCTC	6			
29	GBP1	順	GAGAACTCAGCTGCAGTGCA	7	65°C	O(6.00)	O(p=0.0031)
		逆	TTCTAGCTGGGCCGCTAACT	8			
30	RPS14	順	GACGTGCAGAAATGGCACCT	9	60°C	× (0.96)	
		逆	CAGTCACACGGCAGATGGTT	10			
31	CXCL9	順	CCTGCATCAGCACCAACCAA	11	65°C	O(11.5)	
		逆	TGGCTGACCTGTTTCTCCCA	12			
32	DKFZp564F212	順	CCACATCCACCACTAGACAC	13	60°C	O(4.75)	O(p=0.0541)
		逆	TGACAGATGTCCTCTGAGGC	14			
33	CYP1B1	順	CCTCTTGACCAGGTATCCTG	15	60°C	O(2.33)	
		逆	CCACAGTGTCTTGGGAATG	16			
34	TNFSF10	順	GCTGAAGCAGATGCAGGACA	17	60°C	O(2.50)	O(p=0.0424)
		逆	CTAACGAGCTGACGGAGTTG	18			

マイクロアレイと一致とは、マイクロアレイ解析に用いた6例の定量PCRの結果から、再発遅延群／早期群の比を求め、1.5以上であったものをOとした。

相関とは、22症例の遺伝子発現量と再発までの期間との間で、相関を示したものについて、Oで示し、p値を記載した。

【表 12】

表12 「O型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子」定量PCRの結果

番号	遺伝子	順/逆	プライマー配列 (5'-3')	配列番号	アニーリング温度	マイクロアレイと一致	相関
294	ALB	順	CAAAGCATGGGCAGTAGCTC	19	60°C	O(2.19)	
		逆	CAAGCAGATCTCCATGGCAG	20			
295	NR0B2	順	TOTTCAACCCCGATGTGCCA	21	60°C	O(1.48)	
		逆	AGGCTGGTCGGAATGGAATT	22			
267	AKR1B10	順	CTTGGAAGTCTCCTCTTGCC	23	60°C	O(2.44)	
		逆	ATGAACAGGTCTCTCCGCTT	24			
296	MAFB	順	ACCATCATCAGCAAGCGTCG	25	60°C	O(1.56)	
		逆	TCACCTCGTCTTGTTGAAG	26			
297	BF530535	順	GTCCGCTCACCATCTGTACA	27	65°C	O(3.74)	
		逆	CTGGAGGACAGCTGCCAATA	28			
298	MRPL24	順	TCCTAGAAGGCAAGGATGCC	29	60°C	×(0.92)	
		逆	GTGGGTTTCCTGTCCATAGG	30			
299	DSIP1	順	AACAGGCCATGGATCTGGTG	31	65°C	O(1.85)	
		逆	AGGAATGGAATTCTCCAGC	32			
279	QPRT	順	AGGATAACCATGTGGTGGCC	33	60°C	×(0.413)	O(p=0.0092)
		逆	TGCAGCTCCTCTGGCTTGAA	34			
300	VNN1	順	GCTGGAACTTCAACAGGGAC	35	60°C	×(1.11)	
		逆	CTGAGGATCACTGGTATCGC	36			
301	IRS2	順	TGAAGCTCAACTGCGAGCAG	37	60°C	O(1.57)	
		逆	ACGATTGGCTCTTACTGCGC	38			
302	FMO5	順	ACACAGAGCTCTGAGTCAGC	39	60°C	×(1.13)	
		逆	TCCAGGTTAGGAGGGAAGAC	40			
303	DCN	順	CCTCAAGGTCTTCTCTCTTC	41	60°C	×(0.74)	
		逆	CACCAGGTACTCTGGTAAGC	42			

QPRT遺伝子は、逆相関を示す遺伝子であった。

C型肝炎症例の再発遅延群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補を解析した結果を表11に示す。マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は、8個であり、そのうち、再発までの期間と相関を示した遺伝子は4個であった。

【0057】

C型肝炎症例の再発早期群で、非癌部において発現亢進する遺伝子候補を解析した結果を表12に示す。マイクロアレイの結果と一致した遺伝子は、7個であったが、有意に再発までの期間との相関を示した遺伝子はなかった。しかし、QPRT遺伝子は、再発までの期間と逆相関を示した。従ってこの遺伝子を、再発遅延群において、非癌部において発現亢進する遺伝子と同定した。

【0058】

以上より、C型肝炎症例において再発を予測する非癌部発現遺伝子として、RALGDS遺伝子、GBP1遺伝子、DKFZp564F212遺伝子、TNFSF10遺伝子及びQPRT遺伝子という5つの遺伝子が同定された。上記遺伝子名の内容を以下に示す。

【0059】

RALGDS遺伝子: ral guanine nucleotide dissociation stimulatorの遺伝子

GBP1遺伝子: guanylate-binding protein 1の遺伝子

DKFZp564F212遺伝子: ドイツゲノムプロジェクトで見いだされた発現遺伝子で、遺伝子産物が同定されておらず、機能予測もできていない遺伝子

TNFSF10: TNF (ligand) super family, member 10 の略で、TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)の遺伝子

QPRT遺伝子: quinolinate phosphoribosyltransferase の遺伝子

【産業上の利用可能性】

【0060】

患者及び健康人由来の共通遺伝子と原因別特異遺伝子とを同定することで、予後の予測、再発の予測が可能になるため、診断、治療法開発、治療薬選択の戦略（テーラーメイド医療）に役立てることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 1 】

【図 1】全遺伝子発現プロファイルより作製したサンプル系統樹を示す図である。サンプル間の発現様式の類似性で遺伝子が再配列され、さらに全遺伝子の発現様式の類似性から、サンプルが再配列されて、近縁関係が系統樹として示される。

【配列表フリーテキスト】

【 0 0 6 2 】

配列番号 1 : 合成DNA
配列番号 2 : 合成DNA
配列番号 3 : 合成DNA
配列番号 4 : 合成DNA
配列番号 5 : 合成DNA
配列番号 6 : 合成DNA
配列番号 7 : 合成DNA
配列番号 8 : 合成DNA
配列番号 9 : 合成DNA
配列番号 10 : 合成DNA
配列番号 11 : 合成DNA
配列番号 12 : 合成DNA
配列番号 13 : 合成DNA
配列番号 14 : 合成DNA
配列番号 15 : 合成DNA
配列番号 16 : 合成DNA
配列番号 17 : 合成DNA
配列番号 18 : 合成DNA
配列番号 19 : 合成DNA
配列番号 20 : 合成DNA
配列番号 21 : 合成DNA
配列番号 22 : 合成DNA
配列番号 23 : 合成DNA
配列番号 24 : 合成DNA
配列番号 25 : 合成DNA
配列番号 26 : 合成DNA
配列番号 27 : 合成DNA
配列番号 28 : 合成DNA
配列番号 29 : 合成DNA
配列番号 30 : 合成DNA
配列番号 31 : 合成DNA
配列番号 32 : 合成DNA
配列番号 33 : 合成DNA
配列番号 34 : 合成DNA
配列番号 35 : 合成DNA
配列番号 36 : 合成DNA
配列番号 37 : 合成DNA
配列番号 38 : 合成DNA
配列番号 39 : 合成DNA
配列番号 40 : 合成DNA
配列番号 41 : 合成DNA
配列番号 42 : 合成DNA

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nihon University

<120> A gene which relates to a hepatoma

<130> P03-0134

<150> JP2003-299363

<151> 2003-08-22

<160> 42

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 1

agactgtcag tactgggagc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 2

gtccaggacc cttcttatcc

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 3

gacgtgggaa gacgtttcca

20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
tggatgatgc ccgtctcctt 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 5
aattgcccag ggatgaggca 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 6
tggactcctg gatcttcctc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 7
gagaactcag ctgcagtgca 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 8
ttctagctgg gccgctaact 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 9
gacgtgcaga aatggcacct 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 10
cagtcacacg gcagatggtt 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 11
cctgcatcag caccaaccaa 20

<210> 12
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 12
tggctgacct gtttctccca 20

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 13
ccacatccac cactagacac 20

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 14
tgacagatgt cctctgaggc 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 15
cctcttcacc aggtatcctg 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 16

ccacagtgtc cttgggaatg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 17

gctgaagcag atgcaggaca

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 18

ctaacgagct gacggagttg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 19

caaagcatgg gcagtagctc

20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 20

caagcagatc tccatggcag

20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 21

tcttcaaccc cgatgtgcca

20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 22

aggctggtcg gaatggactt

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 23

cttggaagtc tcctcttggc

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 24
atgaacaggt cctcccgtt

20

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 25
accatcatca ccaagcgtcg

20

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 26
tcacctcgtc cttggtgaag

20

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 27
gtcgcctcac catctgtaca

20

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 28
ctggaggaca gctgccaata

20

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 29
tcctagaagg caaggatgcc 20

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 30
gtgggtttcc tgtccatagg 20

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 31
aacaggccat ggatctggtg 20

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 32
aggactggaa cttctccagc 20

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 33
aggataacca tgtggtggcc 20

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 34
tgcagctcct ctggcttgaa 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 35
gctggaactt caacagggac 20

<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 36
ctgaggatca ctggtatcgc 20

<210> 37
<211> 20

<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 37
tgaagctcaa ctgcgagcag 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 38
acgattggct cttactgcgc 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 39
acacagagct ctgagtcagc 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 40
tccaggtag gaggaagac 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 41

cctcaaggtc ttcctccttc

20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

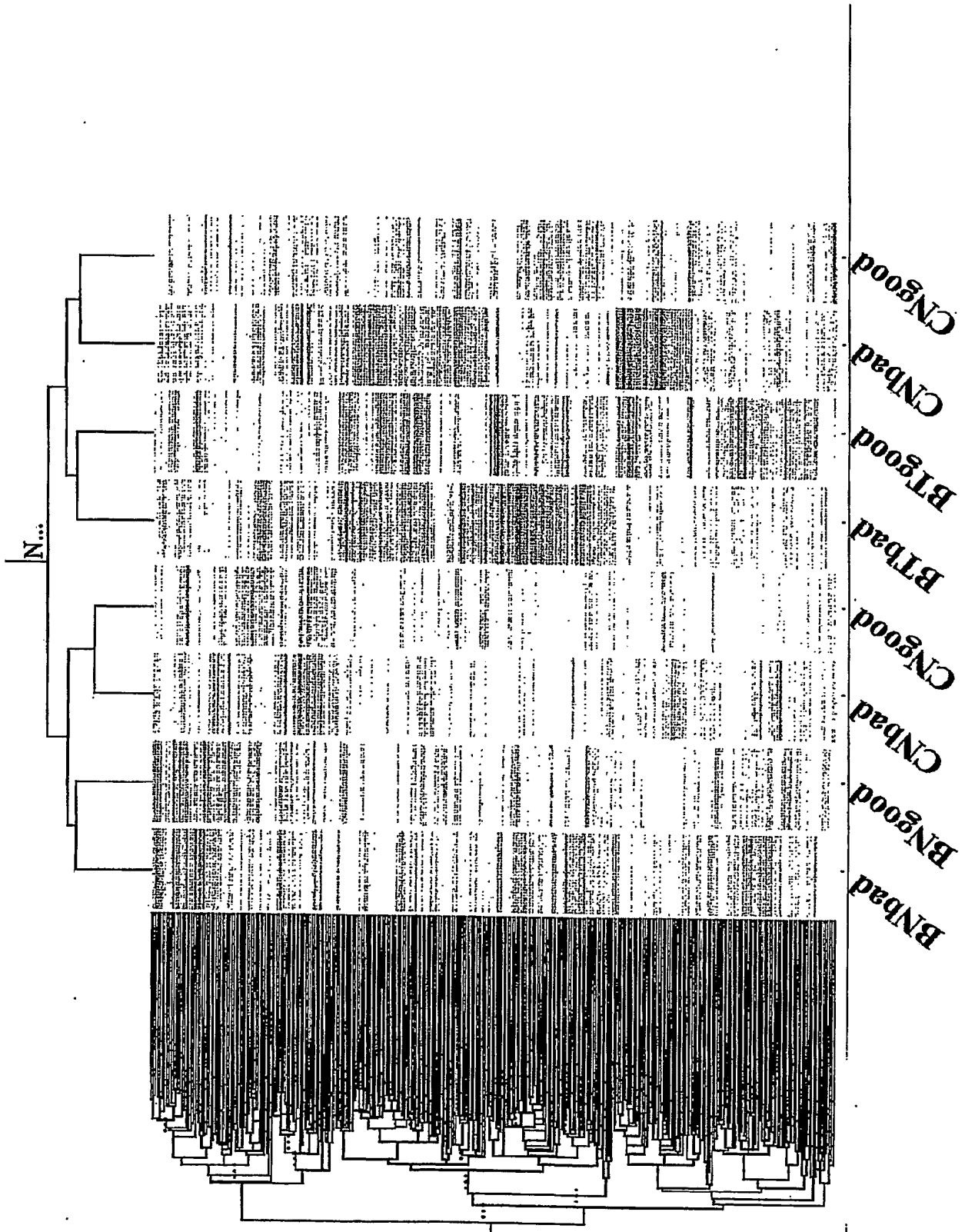
<223> synthetic DNA

<400> 42

caccaggtac tctggtaagc

20

【書類名】 図面
【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】 癌の評価方法の提供。

【課題】 癌の評価方法であって、以下のステップ：

- (a) 検体からtotal RNAを採取し、
 - (b) 表 1 ～ 8 に示される遺伝子の中の少なくとも 1 つ以上の遺伝子の発現量を測定し、
 - (c) 前記測定結果を指標として癌を評価すること
- を含む前記方法。

【解決手段】

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2003-334444
受付番号 50301584571
書類名 特許願
担当官 小松 清 1905
作成日 平成 15 年 11 月 20 日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 899000057
【住所又は居所】 東京都千代田区九段南四丁目 8 番 24 号
【氏名又は名称】 学校法人日本大学

【代理人】

申請人

【識別番号】 100092783

【住所又は居所】 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所
【氏名又は名称】 小林 浩

【選任した代理人】

【識別番号】 100095360
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2-8-7 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所
【氏名又は名称】 片山 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100093676
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲 2-8-7 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所
【氏名又は名称】 小林 純子

【選任した代理人】

【識別番号】 100120134
【住所又は居所】 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所
【氏名又は名称】 大森 規雄



特願 2003-334444

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[899000057]

1. 変更年月日
[変更理由]

1999年 9月17日

新規登録

住所
氏名

東京都千代田区九段南四丁目8番24号
学校法人日本大学